

## Artigo

## Isolamento de Alquenonas da Fração Lipídica em Sedimentos do Talude Sudeste Brasileiro

Luz, L. G.;\* Ausin, B.; Haghypour, N.; Eglinton, T.; Carreira, R. S.

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 11 de fevereiro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

### Alkenones Isolation from Lipid Fraction of Marine Sediments in the Southeastern Continental Brazilian Slope

**Abstract:** Alkenones or long-chain unsaturated ketones (C<sub>36</sub>-C<sub>39</sub>) are a category of lipids produced exclusively by a class of marine phytoplankton (haptophyte algae) present in the surface of the oceans. These compounds are biomarkers (molecular *proxies*) traditionally used in paleoceanographic reconstructions through the proportions between their most abundant compounds (C<sub>37</sub> alkenones) or the determination of their specific isotopic composition, which is dependent on suitable isolation of the lipid compounds. Samples from two sedimentary cores collected from the continental slope of southeastern Brazil were used to apply a methodology of alkenone isolation. The isolation steps, beginning with organic extraction of the sediment, contemplate the formation of urea adduct and silica gel column chromatography impregnated with silver ions. The results of each alkenone isolation phase were monitored by gas chromatography coupled with a flame-ionization detector (GC-FID) and the isolated fractions were injected into a mass spectrometer with accelerators (AMS) for radiometric analysis. The purification methodology was efficient in adequately isolating the alkenones for isotopic analysis, with low content of interfering compounds (< 2 %) and high global recovery (89 %). Losses of less than 11 % during the process occurred particularly in the Ag<sup>+</sup>-SiO<sub>2</sub> step (7 %). Throughout the isolation steps, a preferential loss of C<sub>37</sub> ketones over C<sub>38</sub> and of C<sub>37:3</sub> over C<sub>37:2</sub> was observed. This removal is confirmed by the lack of significant correlation ( $p < 0.05$ ) between the fraction prior to isolation, and the isolated fraction of both the  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$  and  $U_{37}^K$  (C<sub>37:2</sub>/C<sub>37:2</sub> + C<sub>37:3</sub>) values, which indicates that this paleotemperature index should not be evaluated based on the isolated fraction. The final masses of isolated alkenones (12.2-55.2  $\mu\text{g}$ ) acquired in the purification process allowed for the determination of this compound specific radiocarbon, an important tool that can be used to evaluate paleoenvironmental processes.


**Keywords:** Isolation alkenones; sediments; urea adduction; argentation SiO<sub>2</sub>, <sup>14</sup>C-alkenones.

### Resumo

Alquenonas ou cetonas insaturadas de cadeia longa (C<sub>36</sub>-C<sub>39</sub>) são uma categoria de lipídios produzidos exclusivamente por uma classe de fitoplâncton marinho (algas haptófitas) presentes nas camadas superficiais dos oceanos. Estes compostos são biomarcadores (*proxies* moleculares) tradicionalmente utilizados em reconstruções paleoceanográficas através das proporções entre seus compostos mais abundantes (alquenonas C<sub>37</sub>) ou da determinação da sua composição isotópica específica, que é dependente de um isolamento adequado dos compostos lipídicos. Amostras de dois testemunhos sedimentares coletados no talude continental sudeste brasileiro foram utilizadas para aplicar uma metodologia de isolamento das alquenonas. As etapas de isolamento, a partir da extração orgânica do sedimento, contemplam a formação de aduto de ureia e cromatografia de coluna de sílica gel impregnada com íons de prata. Os resultados de cada fase de isolamento de alquenonas foram monitorados por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG/DIC) e as frações isoladas foram injetadas em um espectrômetro de massas com aceleradores (AMS) para análise radiométrica. A metodologia de purificação se apresentou eficiente para isolar as alquenonas de forma adequada para a análise isotópica, com baixo teor de compostos interferentes (< 2 %) e elevada recuperação global (89 %). As perdas ao longo do processo, inferior a 11 %, ocorreram especialmente na etapa de Ag<sup>+</sup>-SiO<sub>2</sub> (7 %). Ao longo das etapas de isolamento verificou-se uma perda preferencial das cetonas C<sub>37</sub> sobre as C<sub>38</sub> e das C<sub>37:3</sub> sobre as C<sub>37:2</sub>. Esta remoção é confirmada pela falta de correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a fração antes do isolamento e a fração isolada tanto dos valores de  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$  quanto de  $U_{37}^K$  (C<sub>37:2</sub>/C<sub>37:2</sub> + C<sub>37:3</sub>), o que indica que este índice de paleotemperatura não deve ser avaliado a partir da fração isolada. As massas finais de cetonas isoladas (12,2-55,2  $\mu\text{g}$  de alquenonas) adquiridas no processo de purificação possibilitaram a determinação do radiocarbono das alquenonas, ferramenta importante que pode ser usada para avaliar processos paleoambientais.

**Palavras-chave:** Isolamento de alquenonas; sedimento; aduto de ureia, íons de prata impregnados em SiO<sub>2</sub>; <sup>14</sup>C-alquenonas.

\* Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais, CTC - Departamento de Química, Rua Marquês de São Vicente, 225, CEP 22451-900. Rio de Janeiro- RJ, Brasil.

 [leticia.luz@aluno.puc-rio.br](mailto:leticia.luz@aluno.puc-rio.br)

DOI:

## Isolamento de Alquenonas da Fração Lipídica em Sedimentos do Talude Sudeste Brasileiro

Letícia G. Luz,<sup>a,\*</sup> Blanca Ausin,<sup>b</sup> Negar Haghypour,<sup>b</sup> Timothy Eglinton,<sup>b</sup> Renato Carreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, LabMAM, Rua Marquês de São Vicente 225, CEP 22451-900. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>b</sup> ETH Zürich, Biogeoscience, Department of Earth Sciences, Geological Institute, 8092 Zürich, Switzerland.

\* [leticiagluz@aluno.puc-rio.br](mailto:leticiagluz@aluno.puc-rio.br)

*Recebido em 12 de novembro de 2018. Aceito para publicação em 16 de janeiro de 2019*

### 1. Introdução

### 2. Seção Experimental

- 2.1. Amostragem da matriz de análise
- 2.2. Extração, saponificação (SAP-N) e fracionamento (F2)
- 2.3. Etapas de isolamento de alquenonas (fração G2)
- 2.4. Monitoramento dos compostos por CG-DIC
- 2.5. Determinação de <sup>14</sup>C-alquenonas por AMS

### 3. Resultados e Discussão

- 3.1. Qualidade do isolamento e recuperação das alquenonas
- 3.2. Integridade das alquenonas nas etapas de isolamento
- 3.3. Performance da medição de radiocarbono

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

Cetonas insaturadas de cadeia longa (C<sub>36</sub>-C<sub>39</sub>), as alquenonas, são biomarcadores moleculares. Alquenonas são uma classe de lipídios produzidos exclusivamente por microfitoplâncton calcário, os cocolitoforídeos presentes na superfície dos oceanos. Estes organismos produzem metil e etil cetonas as quais a quantidade de duplas

ligações podem fornecer um indicador da temperatura das águas em que os organismos vivem.<sup>1</sup> As alquenonas são comumente empregadas como paleotermômetro através da utilização da relação entre as moléculas C<sub>37</sub> com duas ou três insaturações, que permanecem preservadas em sedimentos marinhos. Este é o chamado índice de insaturação das alquenonas ou U<sub>37</sub><sup>K'</sup> utilizado para determinar a história da temperatura da superfície da água (TSM).<sup>2</sup> Além disso, experimentos com

cultura de espécies de algas produtoras de alquenonas mostram que o fracionamento isotópico do hidrogênio ( $\delta D_{\text{alquenonas}}$ ) é dependente da salinidade e da taxa de crescimento das algas produtoras e por isso a  $\delta D_{\text{alquenonas}}$  aparece como uma ferramenta para a reconstrução da salinidade (*proxy* de paleosalinidade) da superfície do mar (SSM).<sup>3</sup>

As metodologias utilizadas para a determinação de *proxies* moleculares lipídicos normalmente utilizam extração orgânica, fracionamento e quantificação por cromatografia líquida ou gasosa e/ou espectrometria de massa. Análises combinadas de lipídios marcadores e suas assinaturas isotópicas fornecem uma nova dimensão das fontes e da informação paleoambiental.<sup>4,5</sup> A partir dos anos 2000, houve um o desenvolvimento das técnicas de análise de isótopos de compostos específicos (CSIA, *Compound-Specific Isotope Analysis*) e possibilita análises de  $\delta D$ ,  $\delta^{13}C$  e  $\Delta^{14}C$  em marcadores orgânicos moleculares presentes em amostras naturais.<sup>5-7</sup>

A cerca de setenta anos, cientistas demonstraram que os raios cósmicos reagem com o nitrogênio ( $^{14}N$ ) da atmosfera e substituem um nêutron por um próton para produzir radiocarbono ( $^{14}C$ ).<sup>7</sup> Na atmosfera o radiocarbono combina com o dióxido de carbono e o  $^{14}CO_2$  formado e se distribui de forma uniforme. Os seres autotróficos incorporam o  $^{14}CO_2$  em seu tecido na forma de proteínas, carboidratos, DNA e lipídios e assim o teor de radiocarbono nos organismos possui a mesma idade da sua fonte de dióxido de carbono. Após a morte, o único processo que afeta o teor de  $^{14}C$  no tecido dos organismos é o decaimento radioativo.<sup>8</sup> Análises de radiocarbono de lipídios individuais (alquenonas, ácidos graxos, alcanos, álcoois, cetóis, dióis, hopanóis, esteróis) em sedimentos marinhos, solos e aerossóis podem ser utilizadas para determinação da origem dos biomarcadores e fornecer aos pesquisadores indicadores de quando e como um determinado organismo ou todo ecossistema vivia no passado.<sup>5, 9</sup> A datação por radiocarbono ( $\Delta^{14}C$ ) é a ferramenta mais utilizada para determinação

da idade de sedimentos do Quaternário Superior em estudos de variações climáticas, aplicada tradicionalmente em carapaças calcárias de foraminíferos presentes nos sedimentos.<sup>9</sup>

Em compostos-específicos, as determinações de  $\Delta^{14}C$  podem ser utilizados para determinar as fontes de carbono usadas por um organismo, a idade aparente do reservatório que fornece esta fonte e transporte lateral. Análise simultânea de  $U_{37}^{K'}$  e  $^{14}C$  nas alquenonas de um mesmo testemunho sedimentar, por exemplo, é capaz de determinar a origem do lipídio marcador e também avaliar os caminhos metabólicos do organismo fonte e em escala global, pode fornecer informações da sua contribuição para o ciclo global do carbono.<sup>6,10</sup> O avanço da técnica radiométrica obtida por espectrometria de massa com aceleradores em  $^{14}C$  (AMS, *Accelerator Mass Spectrometry*) permitiu a datação de biomarcadores individuais por radiocarbono.<sup>4-5, 11</sup> Uma vez que a quantidade de carbono orgânico em sedimentos marinhos varia tipicamente entre 0,1-5,0 % de peso seco, o isolamento dos compostos orgânicos específicos (como as alquenonas) para análise de radiocarbono em quantidade e com pureza apropriada torna-se limitante na geração de dados robustos e precisos.

As alquenonas, assim como os demais compostos lineares, podem ser isoladas das moléculas ramificadas e cíclicas através da adsorção seletiva pela formação do aduto de ureia.<sup>12-13</sup> Essa é uma técnica útil, devido utilizar uma baixa carga térmica e possuir uma alta eficiência de separação. Além disso, o aduto pode ser desfeito de forma simples através da adição de água.<sup>14-16</sup> No início dos anos 1960, a utilização de nitrato de prata na sílica-gel já se mostrava como ferramenta em análises cromatográficas para separação de lipídeos e outros compostos. A interação dos íons  $Ag(I)$  com a dupla ligação de lipídeos insaturados forma um complexo reversível, que devido as características eletrônicas (disponibilidade e densidade dos elétrons nos orbitais) é possível separar os compostos de

acordo com o número, geometria e posição da dupla ligação.<sup>17</sup>

A pesquisa apresenta os resultados do procedimento de isolamento e da integridade das alquenonas de forma inédita para amostras de testemunhos sedimentares da margem continental sudeste do Brasil, região reconhecidamente sujeita a variações oceanográficas e climáticas durante transições temporais como entre períodos glaciais-interglaciais.<sup>18</sup> A partir das alquenonas isoladas, os dados de radiocarbono deste composto específico podem ser usados na avaliação histórica dos processos deposicionais e das mudanças climáticas em escala regional.

## 2. Seção Experimental

### 2.1. Amostragem da matriz de análise

Dois testemunhos sedimentares foram coletados no talude continental sudeste brasileiro, estações 1501 (latitude: 23°58'14,3"S, longitude: 43°06'35,1"W, profundidade de coluna d'água: 328 m) e 1502 (latitude: 24°32'57,6"S, longitude: 42°55'42,9"W, profundidade de coluna

d'água: 1598 m). A amostragem do sedimento foi realizada em junho de 2015, a bordo do R/V Inspector II com testemunhador de pistão (barrilete externo de aço de 6 m, diâmetro interno de 16 polegadas, tubo de polipropileno transparente). As camadas sedimentares foram seccionadas a cada 3 cm de profundidade sedimentar e acondicionadas em frascos de alumínio previamente descontaminados (450 °C, 12 h).

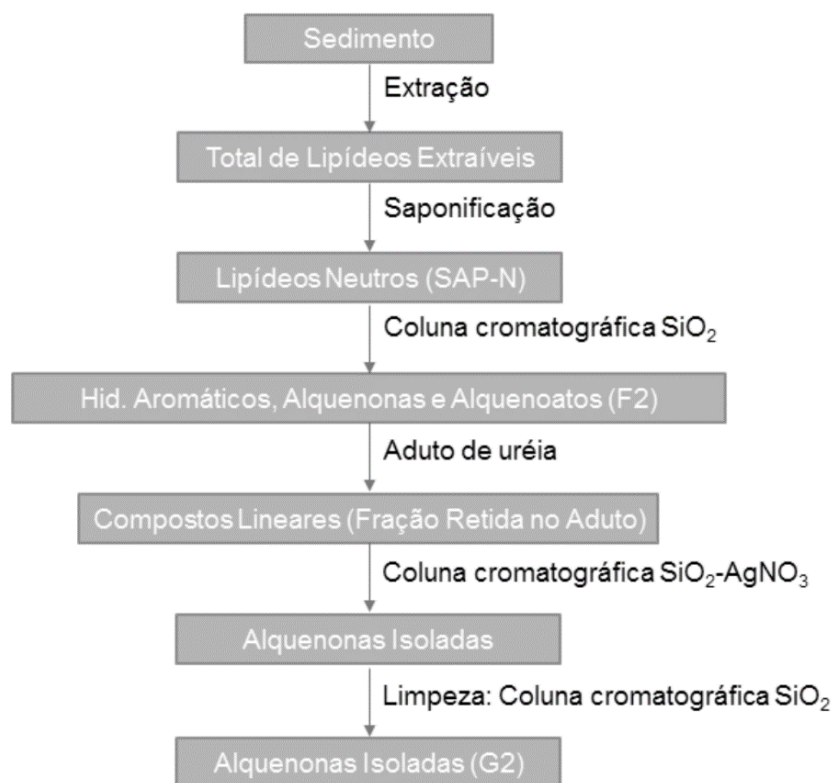
As amostras selecionadas para o isolamento das alquenonas foram 1-09, 1-75 e 1-324 do testemunho 1501 e 2-66, 2-117 e 2-180 do testemunho 1502 (Tabela 1). Além da necessidade de uma quantidade mínima de alquenonas isoladas de 10,0 µg (sensibilidade instrumental para medição de carbono radioativo <sup>14</sup>C), o critério de seleção das camadas sedimentares foi realizado de forma a abranger diferentes períodos de tempo de deposição do material. A determinação das idades das camadas sedimentares (Tabela 1) foi baseada na análise de radiocarbono de espécimes de foraminíferos planctônicos, em que os resultados foram calibrados utilizando a curva marinha de calibração Marine13<sup>19</sup> recomendada como média oceânica em combinação com a correção regional.<sup>20</sup>

**Tabela 1.** Informações das camadas sedimentares selecionadas para o isolamento das alquenonas: idades (anos AP), profundidades sedimentares (cm) e massas de sedimento (g<sub>p.s.</sub>)

Amostra	Testemunho	Idade (anos AP) <sup>a</sup>	Camada Sedimentar (cm)	Massa de sedimento (g <sub>p.s.</sub> ) <sup>b</sup>
1-09	1501	3288	6-9	54,6
1-75	1501	10242	72-75	86,6
1-324	1501	34440	321-324	112,0
2-66	1502	25059	63-66	57,6
2-117	1502	30374	114-117	50,7
2-180	1502	38232	177-180	34,5

<sup>a</sup> Idade em anos AP (antes do presente), a partir de <sup>14</sup>C de foraminíferos planctônicos. <sup>b</sup> Massa de sedimento em g<sub>p.s.</sub> (gramas de peso seco)

## 2.2. Extração, saponificação (SAP-N) e fracionamento (F2)



**Figura 1.** Esquema de análise para isolamento das alquenonas em sedimentos marinhos. Fonte: adaptado de Ohkouchi<sup>11</sup> adaptado. Sequência dos extratos produzidos nas etapas analíticas a partir do sedimento bruto: (1) Total de Lipídeos Extraíveis (TLE, etapa de extração); (2) Fração de Lipídeos Neutros (SAP-N, etapa de saponificação); (3) Fração de hidrocarbonetos aromáticos, alquenonas e alquenoatos (F2, etapa de cromatografia de coluna aberta SiO<sub>2</sub>); (4) Fração de compostos lineares (Fração retida no aduto, etapa de aduto de ureia); e (5) Fração de alquenonas isoladas (G2, etapa de cromatografia de coluna aberta SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub>)

A Figura 1 exibe o esquema analítico usado no isolamento das alquenonas, adaptado do método proposto por Ohkouchi, em 2005.<sup>10</sup> Todos os solventes orgânicos usados foram de alta pureza (grau pureza de pesticida), dedicados a atender à exigência analítica necessária. As massas liofilizadas das seis amostras de sedimento selecionadas estão apresentadas na Tabela 1. Após a liofilização, as amostras foram extraídas com a utilização de um extrator ASE (*Accelerated Solvent Extraction*, 3 ciclos de 20 mL de solvente, tempo total de extração de 11 minutos) com Diclorometano/Metanol (DCM/MeOH, 9:1, v/v) no Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais (LABMAM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de

Janeiro (PUC-Rio). No Grupo de Biogeociências do Instituto Federal de Tecnologia da Universidade de Zurique (ETH, Suíça), os extratos do total de lipídeos extraíveis foram evaporados sob fluxo de N<sub>2</sub> e saponificados com solução de KOH 0,1 M (Sigma-Aldrich®, p.a., ≥86 %) em MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1, v/v, 3 mL, 85°C, 2h, ausência de ar). O pH (> 12) foi verificado no final do aquecimento.

Foi realizada extração líquido-líquido com Hexano (3 x 1 mL) para obtenção da fração de lipídeos neutra (SAP-N). A SAP-N foi separada em 3 frações através de cromatografia de coluna aberta (6 mm x 4 cm) de sílica gel (Sigma-Aldrich®, grau alta pureza, 200-425 mesh) desativada (H<sub>2</sub>O 5 %).

Essas frações foram: Hidrocarbonetos alifáticos (F1); cetonas e hidrocarbonetos aromáticos (F2); e esteróis e álcoois (F3). Elas foram eluídas, respectivamente, com Hexano (4 mL), Hexano/DCM (2:1 v/v, 4 mL) e DCM/MeOH (1:1 v/v, 4 mL), respectivamente. A fração F2 foi utilizada na realização das etapas posteriores de isolamento das alquenonas como descrito nos itens a seguir.

### 2.3. Etapas de isolamento de alquenonas (Fração G2)

#### 2.3.1. Separação de compostos lineares: Aduto de Ureia

A separação dos compostos lineares com configuração *cis* dos cíclicos e dos ramificados foi realizada com aduto de ureia.<sup>16</sup> Após a redução da fração F2 sob fluxo de N<sub>2</sub>, esta foi diluída em Hexano/DCM 2:1 (4,5 mL). Uma solução de ureia (Sigma-Aldrich, p.a., ≥99,5 %) em MeOH 40 mg mL<sup>-1</sup> (1,5 mL) foi adicionada gota a gota na fração F2. Para formação dos cristais, os frascos de F2 contendo ureia sofreram agitação manual (1 min), sendo acondicionados sob refrigeração (30 min) e evaporados sob fluxo de N<sub>2</sub> até *secura*. As etapas a partir da adição de ureia, foram realizados mais 2 vezes. Os cristais precipitados formados (que incluem alquenonas e alquenoatos) foram lavados com Hexano (10 mL, agitação 1 min, descarte do Hexano sobrenadante). Em seguida os cristais do aduto foram solubilizados em H<sub>2</sub>O ultrapura (10 mL) e na sequência, a fase orgânica (fração Retida no Aduto) foi separada através de extração líquido-líquido com Hexano (3 x 10 mL).

#### 2.3.2. Separação de compostos com 2 a 4 insaturações: Coluna SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub>

A partir da fração orgânica da etapa anterior, foi realizada uma cromatografia de

coluna aberta (6 mm x 4 cm) de SiO<sub>2</sub> impregnada com AgNO<sub>3</sub> (nitrato de prata em sílica gel, Aldrich Chemistry, +230 mesh, 50°C, 1h) para separação de 3 frações: compostos saturados e monoinsaturados (G1); compostos di-, tri- e tetra insaturados (G2, que inclui as alquenonas); e os compostos com maior insaturação (G3) que foram eluídos com DCM (6 mL), DCM/MeOH (1:1 v/v, 4 mL), e MeOH (4 mL), respectivamente. As colunas foram cobertas para evitar a foto-oxidação do nitrato de prata ao longo do fracionamento. A fração G2 foi acondicionada em freezer até a limpeza e preparação para medição radioisotópica.

#### 2.3.3. Limpeza da Fração G2

Em todos os casos que o período da análise radiométrica (<sup>14</sup>C) seja superior a 24h após a realização da etapa descrita no item 2.3.2, um novo fracionamento em coluna de sílica gel da fração G2 deve ser executado para remoção de possíveis impurezas (presença de interferentes que podem ser adquiridas durante armazenamento).

### 2.4. Monitoramento dos compostos por CG-DIC

O acompanhamento dos compostos de interesse das 3 etapas do isolamento – frações F2, a Retida no Aduto e G2 – foi realizado por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC, Agilent Technologies® modelo 7890b GC system). O cromatógrafo é equipado com uma coluna capilar de 60 m x 250 μm x 0,25 μm. Para monitorar as frações, a temperatura inicial do forno foi de 50 °C mantida em isoterma por 1 min e na sequência 2 rampas térmicas (até 300 °C por 30 minutos e até 320 °C por 5 minutos), a temperatura do detector foi de 320 °C, e hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. Para injeção, as frações de G2 foram avolumadas com Hexano:2-Propanol (99:1



v/v, 200  $\mu\text{L}$ ). O modo de injeção foi *splitless* (1 min) utilizando 1 a 2  $\mu\text{L}$  da amostra. A identificação das alquenonas foi realizada conforme Prahl e Wakeham<sup>2</sup> e a quantificação foi feita por padronização externa (*n*-Hexatriacontano, 11,4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) para evitar adição de compostos que possam interferir na determinação radiométrica. Brancos de extração foram processados em paralelo com as amostras e não identificaram picos de contaminação.

### 2.5. Determinação de $^{14}\text{C}$ -alquenonas por MAS

A determinação dos parâmetros radioisotópicos nas amostras de alquenonas

isoladas (fração G2) foi realizada através da técnica radiométrica obtida por espectrometria de massa com aceleradores em  $^{14}\text{C}$  (AMS, *Accelerator Mass Spectrometry*) denominada sistema MICADAS (*Mini Radiocarbon Dating System*) no laboratório *Ion Beam Physics* no Instituto Federal de Tecnologia da Universidade de Zurique (ETH, Suíça). A técnica utilizada é capaz de medir baixas concentrações de  $^{14}\text{C}$  devido as altas energias empregadas no acelerador de partículas e aos analisadores de massa magnéticos e eletrostáticos.

## 3. Resultados e Discussão

**Tabela 2.** Resultados das massas ( $\mu\text{g}$ ) de alquenonas  $\text{C}_{37}$ - $\text{C}_{39}$  obtidas nas etapas do isolamento.

Amostra	Massas de Alquenonas ( $\mu\text{g}$ )		
	Etapas de Isolamento		
	F2	Retida no Aduto	G2
1-09	13,7	13,1	12,2
1-75	17,3	16,7	16,1
1-324	39,9	38,8	36,7
2-66	60,9	58,5	55,2
2-117	34,6	33,2	30,8
2-180	22,4	21,7	19,8

F2: fração antes da etapa de isolamento; Retida no Aduto: fração retida no aduto de ureia; e G2: fração após o isolamento.

### 3.1. Qualidade do isolamento e recuperação das alquenonas

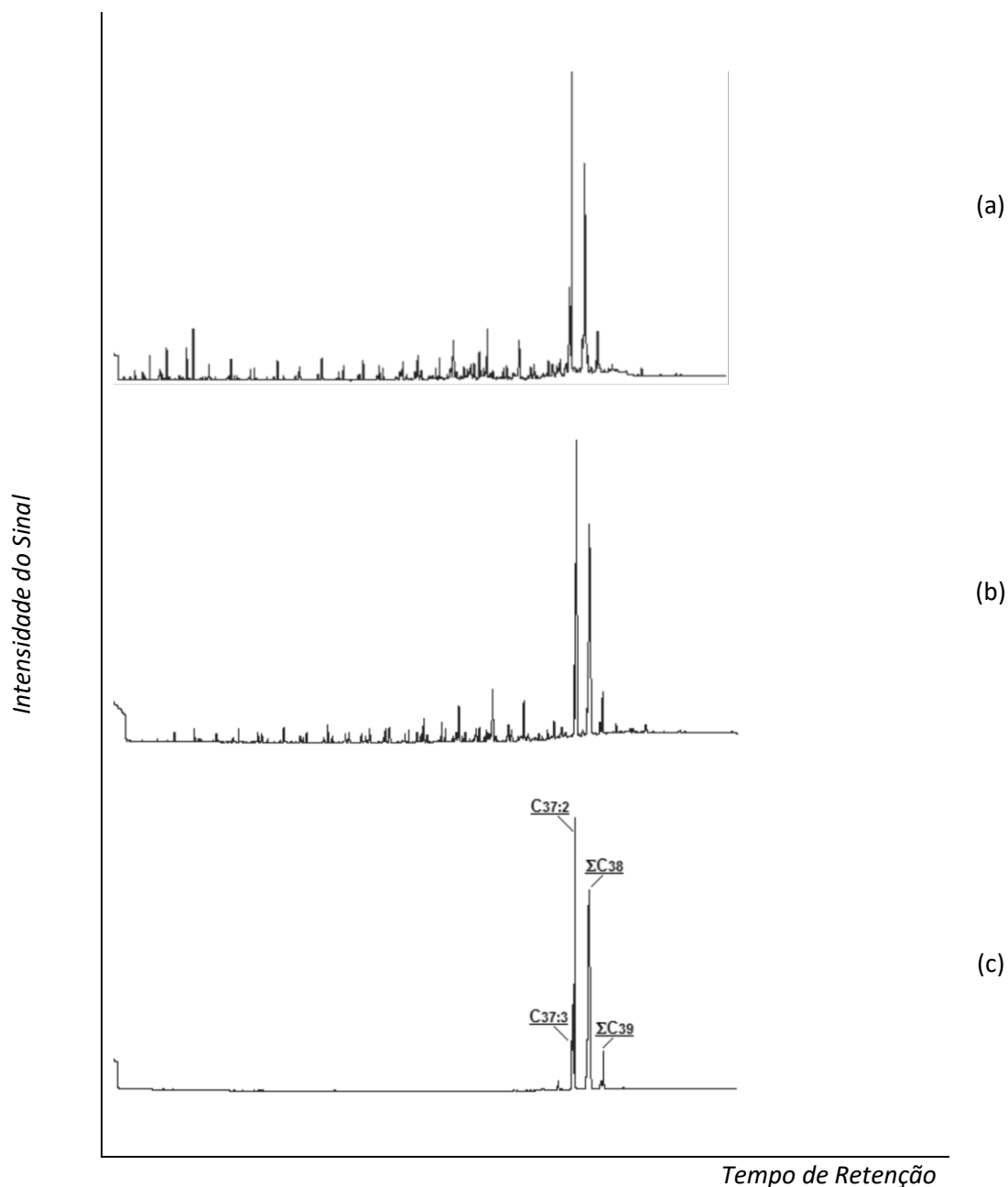
Um exemplo do monitoramento das frações das diferentes fases de purificação para uma das amostras analisadas (2-117) através da caracterização dos perfis cromatográficos está apresentado na Figura 3. Dentre as alquenonas presentes nas amostras, as  $\text{C}_{37}$ - $\text{C}_{38}$  foram as mais

abundantes, como já caracterizadas em estudos anteriores.<sup>21-23</sup> As quantidades das alquenonas, em  $\mu\text{g}$ , a partir das massas de sedimentos marinho inicialmente extraídos estão listados na Tabela 2.

Observa-se que a fração F2, através do comportamento da linha de base de seu cromatograma (Figura 2a), apresenta muitos compostos diferentes das alquenonas (alquenoatos, aldeídos e hidrocarbonetos aromáticos). A separação dos analitos pelo

aduto de ureia foi baseada na oclusão (aprisionamento) seletiva das substâncias lineares e sua eficácia consiste em uma boa recristalização e lavagem dos cristais. Apesar da presença de picos interferentes (compostos lineares) no cromatograma

(Figura 2b), a alta eficiência da extração das alquenonas na fração retida na ureia pode ser confirmada pelo baixo percentual de perda das cetonas (< 5 %, n = 6) em relação à F2 (Tabela 2, Figura 3).

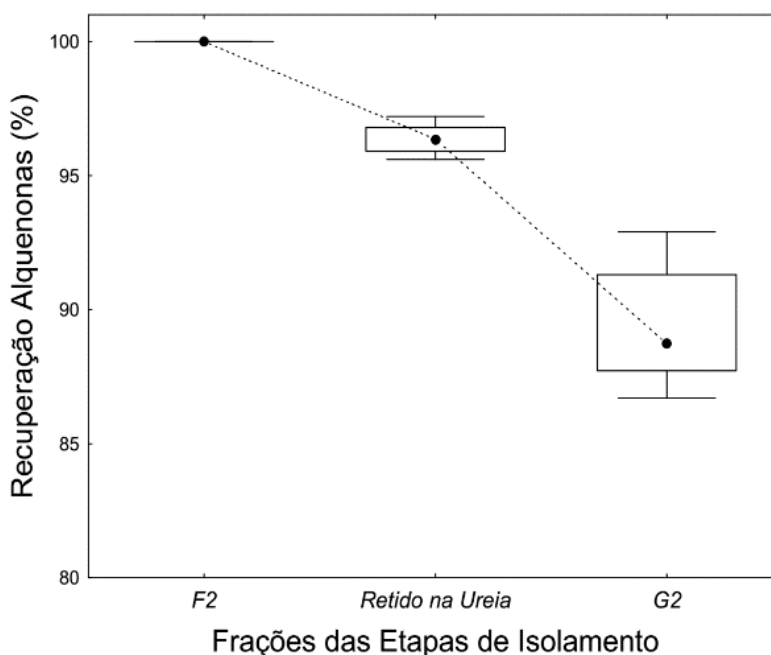


**Figura 2.** Exemplo de cromatogramas CG-DIC das frações obtidas nas etapas do isolamento das alquenonas (amostra 2-117): (a) F2, fração antes do isolamento; (b) fração retida no aduto de ureia e (c) G2, fração após o isolamento



O tratamento da amostra em coluna preenchida com sílica aditivada com íons de Ag(I) mostrou-se útil na separação dos compostos orgânicos insaturados e a fração G2 (Figura 2-c) apresentou alta pureza de alquenonas, com uma quantidade bastante reduzida de interferentes (< 2 %, n = 6). A média de recuperação global da quantidade

de alquenonas foi de 89,3 %  $\pm$  2,4 % (n = 6, Figura 3). Proporcionalmente, houve uma maior perda na etapa da coluna de sílica gel impregnada com AgNO<sub>3</sub> (7,0 %  $\pm$  1,8 %, ver item 3.2) em comparação ao aduto de ureia (3,6 %  $\pm$  0,6 %). As impurezas totais nos cromatogramas foi menor que 2 % em todas as amostras analisadas.



**Figura 3.** Variação de recuperação das alquenonas C<sub>37</sub>-C<sub>39</sub> ao longo das etapas de isolamento (F2: fração antes do isolamento; Retido na ureia: fração retida o aduto de ureia; e G2: fração após o isolamento). Símbolo: média, caixa: percentis de 25 % e 75 % e linha sólida: mínimo e máximo

### 3.2. Integridade das alquenonas nas etapas de isolamento

Além de estimar a recuperação global, houve o acompanhamento da integridade das alquenonas C<sub>37</sub> (C<sub>37:3</sub> e C<sub>37:2</sub>) e C<sub>38</sub> (somatório total) no procedimento de isolamento. Para realizar esta avaliação, este estudo utiliza 2 razões: (i) somatório da quantidade de alquenonas C<sub>37:3</sub> e C<sub>37:2</sub>/somatório da quantidade de alquenonas C<sub>38</sub>,  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$ ; e (ii) cetonas C<sub>37</sub> di-insaturada/somatório das cetonas C<sub>37</sub> di- e tri-insaturada, C<sub>37:2</sub>/C<sub>37:2</sub> + C<sub>37:3</sub> ou índice U<sub>37</sub><sup>K'</sup> (grau de insaturação das alquenonas) desenvolvido em 1987 por Prahl e

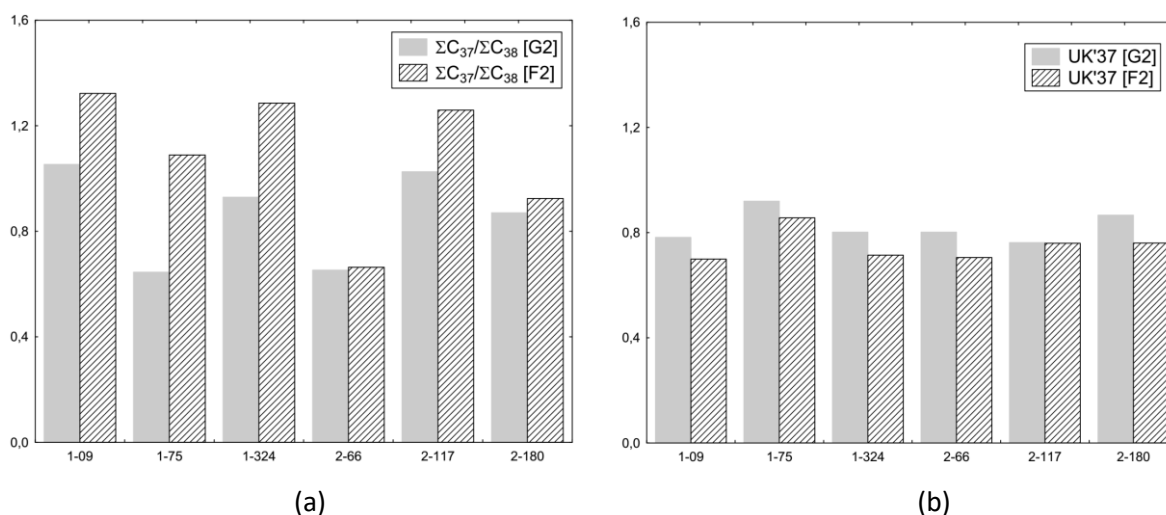
Wakeham.<sup>2</sup> As taxas  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$  e U<sub>37</sub><sup>K'</sup> foram determinadas tanto na fração de alquenonas isoladas (G2, fração após o isolamento), como na fração F2 (fração antes do isolamento), que é a utilizada regularmente para a determinação de índices paleoclimáticos (Figura 4).

Apesar de não comumente encontrado na literatura como índice histórico, a razão C<sub>37</sub>/C<sub>38</sub> das alquenonas tem sido utilizada em amostras ambientais e cultura de algas para indicar a distribuição do comprimento das cadeias de carbono das alquenonas e estimar se a temperatura superficial da água afeta a proporção C<sub>37</sub>-C<sub>38</sub>.<sup>22,24</sup> O procedimento de isolamento das alquenonas ocasionou uma

perda relativa dos compostos  $C_{37}$  em relação aos  $C_{38}$  em todas as amostras analisadas (Figura 4-a), em que a razão  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$  no G2 foi de  $0,86 \pm 0,18$  ( $n = 6$ ) enquanto no F2 foi de  $1,09 \pm 0,26$  ( $n = 6$ ). Os resultados da razão  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$  na fração G2 e F2 não revelaram uma correlação significativa para  $p < 0,05$  ( $r^2 = 0,68$ ;  $p = 0,137$ ;  $n = 6$ ), o que indica um fracionamento diferenciado entre as alquenonas  $C_{37}$  e  $C_{38}$  ao longo das etapas do isolamento.

O índice  $U_{37}^{K'}$  representa a relação entre o grau de insaturação de alquenonas  $C_{37}$  e é largamente utilizado para determinar a história da temperatura da superfície do mar (TSM) de uma dada região. Este indicador de paleotemperatura depende somente das

proporções relativas das cetonas  $C_{37}$  comuns, que varia positivamente com a temperatura pois os produtores das alquenonas, principalmente os cocolitoforídeos *Emiliana huxleyi* e *Gephyrocapsa oceanica*, alteram o padrão de síntese de insaturação das cetonas de cadeia longa di-, tri- e tetra-insaturadas em função da temperatura das águas superficiais onde vivem.<sup>21,24-25</sup> A Figura 4-b apresenta os resultados de  $U_{37}^{K'}$  ( $C_{37:2}/C_{37:2} + C_{37:3}$ ) e evidencia a perda preferencial das alquenonas  $C_{37:2}$  em comparação às  $C_{37:2}$  ao longo dos procedimentos de purificação, em que são observados maiores valores de  $U_{37}^{K'}$  na fração de alquenonas isoladas G2 ( $0,82 \pm 0,06$ ;  $n = 6$ ) do que na fração F2 ( $0,75 \pm 0,06$ ;  $n = 6$ ), antes das etapas de isolamento.

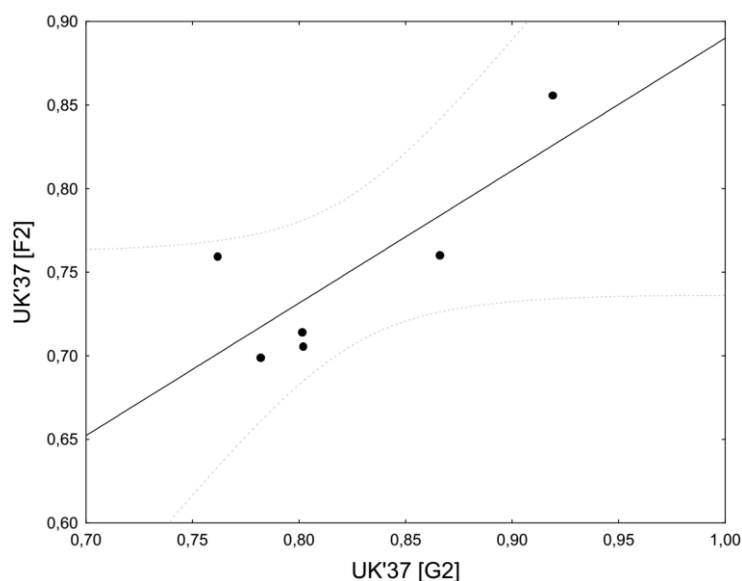


**Figura 4.** (a) Razão entre as alquenonas  $C_{37}$  e as alquenonas  $C_{38}$ ,  $\Sigma C_{37}/\Sigma C_{38}$ , e (b) Razão de alquenonas  $C_{37}$  di-insaturadas pelo somatório de cetonas  $C_{37}$  di- e tri-insaturadas,  $U_{37}^{K'}$  ( $C_{37:2}/C_{37:2} + C_{37:3}$ ), nas frações antes (F2, colunas em cinza) e após (G2, colunas com traços radiais) as etapas de isolamento

Apesar de não conseguirmos revelar uma razão clara, é possível que as diferentes interações de densidade eletrônica entre as cetonas  $C_{37:2}$  e  $C_{37:3}$  e a variada afinidade com  $\text{SiO}_2\text{-AgNO}_3$  ocasionem este desvio. Compostos com maior número de ligações múltiplas conjugadas possuem maior afinidade pela fase estacionária devido à alta densidade eletrônica, com formação de complexos estáveis e maior retenção.<sup>14,17</sup> A regressão linear dos dados de  $U_{37}^{K'}$  das

frações G2 e F2 está exibida na Figura 5 e apesar do coeficiente de determinação indicar um elevado ajuste de regressão linear ( $r^2 = 0,80$ ), a correlação não se apresentou significativa para 95 % dos dados ( $p = 0,058$ ). Na prática ao aplicar o cálculo da TSM conforme a calibração de Muller<sup>23</sup>, há uma discrepância média de  $2,2^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  ( $0,1^\circ\text{C}$  a  $2,9^\circ\text{C}$ ) entre as frações G2 e F2, valor acima do erro padrão estimado pela equação ( $1,5^\circ\text{C}$ ;  $n = 370$ ). Este resultado indica que

fração após o isolamento (G2) pode não ser adequada como *proxy* de paleotemperatura.



**Figura 5.** Relação dos valores de  $U_{37}^K$  ( $C_{37:2}/C_{37:2} + C_{37:3}$ ) determinados nas frações antes (F2) e após (G2) as etapas de isolamento. Linha sólida representa a regressão linear e linha tracejada nível de significância de 95 %

### 3.3. Performance da medição de radiocarbono

Foram utilizados dois padrões de acompanhamento da performance do sistema AMS MICADAS (ETH-Zurique) durante as determinações de  $^{14}C$  das amostras. Nos dados são aplicadas as etapas de subtração do *background* e branco e correção do fracionamento (fração moderna, Fm) utilizando a medida de  $^{13}C/^{12}C$  ( $\delta^{13}C$ ). O padrão de ácido oxálico II (NIST SRM 4990C) é

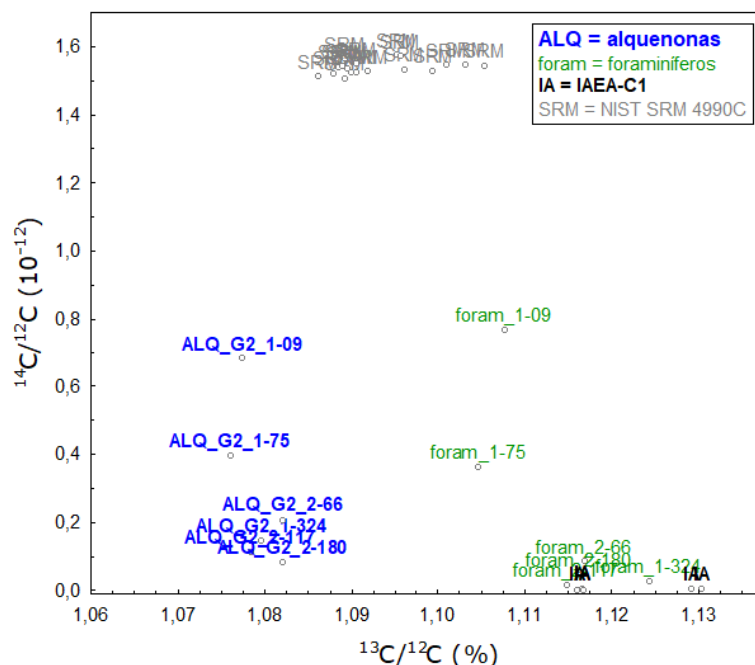
um material de referência certificado para radioatividade e foi utilizado como padrão de normalização para definição da Fm<sup>26</sup>, em que os resultados demonstraram um erro instrumental adequado para as análises, inferior a 0,001 unidades de Fm. O padrão de material de referência IAEA-C1 (material antigo com pouca quantidade de radiocarbono)<sup>27</sup> de atividade de  $^{14}C$  conhecida também foi analisado em paralelo com as amostras, e evidenciou valores aceitáveis como estimativa de branco instrumental (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados nominais dos padrões de performance instrumental do sistema AMS MICADAS.

Padrões utilizados	N	F <sup>14</sup> C	$\delta^{13}C$ (‰)	Valores de Referência
NIST SRM 4990C	18	1,3409 ± 0,0066	-17,6 ± 2,5	(F = 1,3407; $\delta^{13}C$ = -17,8) <sup>26</sup>
IAEA-C1	5	0,0029 ± 0,0009	-	(F = 0,00 ± 0,002) <sup>27</sup>

A Figura 6 exibe os resultados experimentais AMS MICADAS da relação entre as razões  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  das alquenonas isoladas (fração G2) e das carapaças calcárias de foraminíferos (dados não publicados) nas camadas sedimentares (1-09, 1-75, 1-324, 2-66, 2-117 e 2-180), além dos padrões descritos. Com exceção das amostras 1-09 e 1-75, as baixas razões  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  de cetonas e foraminíferos atestam a presença de carbono antigo nas demais camadas sedimentares. Comparativamente, nestas camadas sedimentares existe maior quantidade de radiocarbono nas alquenonas

(em azul, Figura 6) do que nas carapaças de foraminíferos (em verde, Figura 6). Este diferente período de tempo em que as alquenonas alcançaram o sedimento (idade aparente) pode representar processos distintos de transporte e sedimentação do material depositado entre épocas mais recentes (ex. Holoceno) e mais antigas (ex. período glacial) do testemunho sedimentar.<sup>4-6,18</sup> Adicionalmente, os padrões exibiram resultados médios (Tabela 3) e distribuição espacial (Figura 6) que podem confirmar a qualidade da análise radiométrica (reprodutibilidade e exatidão) das amostras.



**Figura 6.** Dados das razões  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $10^{-12}$ ) versus razões  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (%) adquiridas nas análises de espectrometria de massas com aceleradores (AMS, MICADAS) de alquenonas isoladas (fração G2, em azul); de carapaças calcárias de foraminíferos (em verde); e dos padrões de controle de performance instrumental: IAEA-C1 (em preto) e NIST SRM 4990C (ácido oxálico II, em cinza)

#### 4. Conclusão

O método de isolamento das alquenonas foi aplicado em amostras de sedimentos marinhos coletados no talude continental sudeste brasileiro e os resultados mostraram que os procedimentos com aduto de ureia e

com sílica gel impregnada com íons  $\text{Ag(I)}$  foram eficientes na separação de compostos individuais de cetonas insaturadas de longa cadeia a partir de matrizes complexas. A alta recuperação e o baixo teor de compostos interferentes possibilitaram a obtenção de alquenonas isoladas em quantidade necessária para medição de radiocarbono por AMS, ferramenta de elevada importância em estudos de avaliação histórica do material

orgânico depositado em ambientes marinhos. A partir da avaliação da integridade das alquenonas ao longo do processo de purificação, há indícios de modificação na proporção das cetonas mais abundantes ( $C_{37}$  e  $C_{38}$ ), o que salienta que índices paleoclimáticos comuns de alquenonas (como  $U_{37}^K$ ) não devem ser avaliados a partir da fração isolada.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Agradecemos à empresa SeaSeep® pelo suporte com embarcação e amostragem e ao Grupo de Biogeociências do ETH-Zurique, Suíça por disponibilizar instalações e equipamentos para os ensaios e análises.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Brassell, S. C.; Eglinton, G.; Marlowe, I. T.; Pflaumann, U.; Sarnthein, M. Molecular stratigraphy: a new tool for climatic assessment. *Nature* **1986**, *320*, 129. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Prahl, F. G.; Wakeham, S. G. Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for palaeotemperature assessment. *Nature* **1987**, *330*, 367. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Schouten, S.; Ossebaar, J.; Schreiber, K.; Kienhuis, M.V.M.; Langer, G.; Benthien, A.; Bijma, J. The effect of temperature, salinity and growth rate on the stable hydrogen isotopic composition of long chain alkenones produced by *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Biogeosciences* **2006**, *3*, 113 [CrossRef]
- <sup>4</sup> Pearson, A.; McNichol, A. P.; Benitez-Nelson, B. C.; Hayes, J. M.; Eglinton, T. I. Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: a case study using compound-specific  $\Delta^{14}C$  analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2001**, *65*, 3123 [CrossRef]
- <sup>5</sup> Ingalls, A. E., & Pearson, A. Ten years of compound-specific radiocarbon analysis. *Oceanography* **2005**, *18*, 181 [CrossRef]
- <sup>6</sup> Pearson, A.; Eglinton, T. I. The origin of n-alkanes in Santa Monica Basin surface sediment: a model based on compound-specific  $\Delta^{14}C$  and  $\delta^{13}C$  data. *Organic Geochemistry* **2000**, *31*, 1103 [CrossRef]
- <sup>7</sup> Sessions, A. Review: Isotope-ratio detection for gas chromatography. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 1946 [CrossRef]
- <sup>8</sup> Libby, W. F. Atmospheric Helium Three and Radiocarbon from Cosmic Radiation. *Physical Reviews* **1946**, *69*, 671 [CrossRef]
- <sup>9</sup> Bradley, R. S.; *Dating Methods I*. Em *Paleoclimatology*. 3a. ed., Academic Press: San Diego, 2015, cap. 3. [CrossRef]
- <sup>10</sup> Farrimond, P.; Eglinton, G.; Brassell, S. C. Alkenones in Cretaceous black shales, Blake-Bahama Basin, western North Atlantic. *Organic Geochemistry* **1986**, *10*, 897 [CrossRef]
- <sup>11</sup> Ohkouchi, N.; Xu, L.; Reddy, C. M.; Montluçon, D.; Eglinton, T. I. Radiocarbon Dating of Alkenones from Marine Sediments: I. Isolation Protocol. *Radiocarbon* **2005**, *47*, 401 [CrossRef]
- <sup>12</sup> Morris, L. J.; Wharry, D. M.; Hammond, E. W. Chromatographic behaviour of isomeric long-chain aliphatic compounds: II. Argentation thin-layer chromatography of isomeric octadecenoates. *Journal of Chromatography A* **1967**, *31*, 69 [CrossRef]
- <sup>13</sup> van Soelen, E. E.; Lammers, J. M.; Eglinton, T. I.; Sinninghe Damsté, J. S.; Reichart, G. J. Unusual  $C_{35}$  to  $C_{38}$  alkenones in mid-Holocene sediments from a restricted estuary (Charlotte Harbor, Florida). *Organic Geochemistry* **2014**, *70*, 20 [CrossRef]
- <sup>14</sup> Yan, Y.; Wang, X.; Liu, Y.; Xiang, J.; Wang, X.; Zhang, H.; Yao, Y.; Liu, R.; Zou, X.; Huang, J.; Jin, Q. Combined urea-thin layer chromatography and silver nitrate-thin layer chromatography for micro separation and

- determination of hard-to-detect branched chain fatty acids in natural lipids. *Journal of Chromatography A* **2015**, 1425, 293 [CrossRef]
- <sup>15</sup> Swern, D. *Technique of Separation: urea complexation*. Em: *Fatty acids*; Markely K. S., 2a ed.; Interscience Publishers: New York, 1964.
- <sup>16</sup> Nwadinigwe, C. A.; Nwobodo, I. O. Analysis of n-paraffins in light crudes: Molecular sieve and urea adduction techniques revisited. *Fuel* **1994**, 73, 779. [CrossRef]
- <sup>17</sup> Nikolova-Damyanova, B.; Christie, W. W.; Herslöf, B. Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1996**, 749, 47. [CrossRef]
- <sup>18</sup> Mahiques, M. M., Sousa, S. H. M., Furtado, V. V., Tessler, M. G., Toledo, F. A. d. L., Burone, L., Figueira, R. C. L., Klein, D. A., Martins, C. C., Alves, D. P. V. The Southern Brazilian shelf: general characteristics, quaternary evolution and sediment distribution. *Brazilian Journal of Oceanography* **2010**, 58, 25 [CrossRef]
- <sup>19</sup> Reimer, P. J., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J. W., G., B. P., Bronk Ramsey, C., Buck, C. E., Cheng, H., Edwards, R. L., Friedrich, M., Grootes, P. M., Guilderson, T. P., Hafliðason, H., Hajdas, I., Hatte, C., Heaton, T. J., Hoffmann, D. L., Hogg, A. G., Hughen, K. A., Felix Kaiser, K. Kromer, B., Manning, S. W., Niu, M., Reimer, R. W., Richards, D. A., Marian S. E., Southon, J. R., Staff, R. A., Turney, C. S. M., van der Plicht, J. Intcal13 and marine13 radiocarbon age calibration curves 0–50,000 years cal bp. *Radiocarbon* **2013**, 55, 1869. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Alves, E., Macario, K., Souza, R., Pimenta, A., Douka, K., Oliveira, F., Chanca, I., Angulo, R. Radiocarbon reservoir corrections on the Brazilian coast from pre-bomb marine shells. *Quaternary Geochronology* **2015**, 29, 30. [CrossRef]
- <sup>21</sup> Volkman, J. K.; Eglinton, G.; Corner, E. D. S.; Forsberg, T. E. V. Long-chain alkenes e alkenones in the marine coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Phytochemistry* **1980**, 19, 2619. [CrossRef]
- <sup>22</sup> Conte, M. H.; Eglinton, G. Alkenone and alkenoate distributions within the euphotic zone of the eastern North Atlantic: correlation with production temperature. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **1993**, 40, 1935. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Müller, P. J.; Kirst, G.; Ruhland, G.; von Storch, I.; Rosell-Melé, A. Calibration of the alkenone paleotemperature index U37K' based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60°N-60°S). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1998**, 62, 1757. [CrossRef]
- <sup>24</sup> Yamamoto, M.; Shiraiwa, Y.; Inouye, I. Physiological responses of lipids in *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* (Haptophyceae) to growth status and their implications for alkenone paleothermometry. *Organic Geochemistry* **2000**, 31, 799. [CrossRef]
- <sup>25</sup> Beltran, C.; Flores, J. A.; Sicre, M. A.; Baudin, F.; Renard, M.; de Rafélis, M. Long chain alkenones in the Early Pliocene Sicilian sediments (Trubi Formation — Punta di Maiata section): Implications for the alkenone paleothermometry. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2011**, 308, 253. [CrossRef]
- <sup>26</sup> Stuiver M. International agreements and the use of the new oxalic acid standard, *Radiocarbon* **1983**, 25, 793. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Molnár, M., Janovics, R., Major, I., Orsovski, J., Gönczi, R., Veres, M., Leonard, A. G., Castle, S. M., Lange, T. E., Wacker, L., Hajdas, I., Jull, A. J. T. Status Report of the New AMS 14C Sample Preparation Lab of the Hertelendi Laboratory of Environmental Studies (Debrecen, Hungary). *Radiocarbon* **2013**, 55, 665. [CrossRef]